卡尼鄂拉蜂锌转运蛋白-7 相似蛋白(ZnT-7-like)的基因克隆、抗体制备及差异表达

沈 杰，刘振国，沈 芳，吉 挺*

(扬州大学动物科学与技术学院，江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室，江苏扬州 225009)

摘要：【目的】本研究旨在克隆卡尼鄂拉蜂 *Apis mellifera carnica* 锌转运蛋白-7 相似蛋白(zinc transporter 7-like, ZnT-7-like)基因，制备 ZnT-7-like 多克隆抗体，了解该基因在卡尼鄂拉蜂王浆腺中不同时期的差异表达情况。【方法】运用 RT-PCR 法从卡尼鄂拉蜂王浆腺总 RNA 中扩增 ZnT-7-like 基因，进行生物信息学分析，为避开跨膜结构的干扰，选择克隆其部分序列(273 bp)作为多肽免疫序列。将其亚克隆入原核表达载体 pGEX-4T-1，转入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)中诱导表达获得融合蛋白，然后将融合蛋白纯化后免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体，分别用间接 ELISA 和 Western blot 检测抗体的效价和特异性，最后采用实时荧光定量 RT-PCR 以及 Western blot 技术检测该基因在不同日龄成虫王浆腺中的相对表达量。【结果】克隆得到卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因，大小为 1 065 bp。SDS-PAGE 电泳结果显示融合蛋白成功表达；制备的多克隆抗体效价高达 1∶64 000，且具有很高的特异性。ZnT-7-like 在卡尼鄂拉蜂 5 个日龄成虫中的转录情况存在较大差异，表现为 3 日龄成虫中的表达量极显著高于其他日龄($P<0.01$)，12 日龄表达量最低，其他日龄间表达量两两差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)；ZnT-7-like 蛋白表达与转录水平基本一致。【结论】成功克隆了卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因，制备了兔抗蜂 ZnT-7-like 多克隆抗体，并在转录和翻译两个水平上测定了 ZnT-7-like 在卡尼鄂拉蜂王浆腺中不同时期的相对表达量。这些结果为深入研究卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因的功能奠定了基础。

关键词：卡尼鄂拉蜂；王浆腺；锌转运蛋白-7 相似蛋白；基因克隆；抗体制备；差异表达

中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2013)10-1117-10

Gene cloning, polyclonal antibody preparation and differential expression of zinc transporter 7-like (ZnT-7-like) in *Apis mellifera carnica* (Hymenoptera: Apidae)

SHEN Jie, LIU Zhen-Guo, SHEN Fang, JI Ting* (College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics & Breeding and Molecular Design, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: 【Aim】In this study, we cloned a zinc transporter 7-like (ZnT-7-like) gene in *Apis mellifera carnica* in order to prepare the polyclonal antibody against recombinant ZnT-7-like, and to understand ZnT-7-like gene in hypopharyngeal glands of *A. m. carnica* differentially expressed in different periods. 【Methods】The ZnT-7-like gene in *A. m. carnica* was amplified by RT-PCR method from the total RNA of hypopharyngeal glands. To avoid the interference of transmembrane domains, the partial sequence (273 bp) was chosen as peptide sequence through bioinformatics analysis, then sub-cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1 and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) host cells. Fusion protein was purified and used to immunize New Zealand white rabbits so as to prepare polyclonal antibody. We also detected the sensitivity and specificity of the polyclonal antibody prepared through indirect ELISA and Western blot methods, respectively. Finally, the expression levels of this gene in different day-old adults were detected by real-rime quantitative RT-PCR and Western blot methods. 【Results】ZnT-7-like gene was cloned from *A. m. carnica* , and the obtained fragment was 1 065 bp in length. SDS-PAGE electrophoresis showed that the fusion protein was well expressed. The anti-ZnT-7-like polyclonal antibody showed high sensitivity (1∶64 000) and specificity. There was a big difference in the transcriptional level of ZnT-7-like gene in different day-old *A. m. carnica* adults. The expression

基金项目：国家蜂产业技术体系(NYCYTX-43)；国家自然科学基金项目(31172272)

作者简介：沈杰，男，1987 年生，浙江杭州人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂遗传资源调查分析和保护，E-mail：shenjie_hz@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：tji@yzu.edu.cn

收稿日期 Received：2013-08-06；接受日期 Accepted：2013-09-18

level of 3-day-old bees was extremely significantly higher than that of other ages ($P<0.01$) , the 12-day-old bees showed the minimum expression level, and significant ($P<0.05$) or extremely significant differences ($P<0.01$) existed among 6-day-old, 9-day-old and 12-day-old bees. The protein expression level of ZnT-7-like was generally consistent with the transcription level. 【Conclusion】The ZnT-7-like gene was successfully cloned, the rabbit anti-*A. m. carnica* ZnT-7-like polyclonal antibody was prepared, and the relative expression of ZnT-7-like in hypopharyngeal glands of different day-old *A. m. carnica* adults were measured at the transcription and translation levels. These results lay the foundation for further studies on functions of *A. m. carnica* ZnT-7-like gene.

Key words: *Apis mellifera carnica*; hypopharyngeal gland; zinc transporter 7-like (ZnT-7-like); gene cloning; antibody preparation; differential expression

必需微量元素锌是机体多种酶的必需组分或激活因子，与机体发育、细胞凋亡、免疫功能、内分泌调节、蛋白质和核酸代谢等一系列生理活动密切相关(Sensi *et al.*, 2009; Prasad, 2009; Zhang *et al.*, 2013)。锌缺乏可造成多系统的损害，例如胚胎期小鼠锌缺乏会损伤神经干细胞，并造成学习记忆的不可逆下降(Wang *et al.*, 2001)。机体锌离子过量也会对生理造成危害，因此，锌离子代谢的稳态平衡对维持机体正常生理功能尤为重要(Shilstein *et al.*, 2004; Cousins *et al.*, 2006; Lichten and Cousins, 2009)。锌转运蛋白(zinc transporter, ZnT)有两个家族：ZIP 家族和 ZnT 家族，ZnT 家族又称 SLC30A 家族，共有 10 个成员，包括 ZnT-1 ~ ZnT-10(Kambe *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002; Cragg *et al.*, 2002; Lopez and Kelleher, 2009)，其功能主要为协助锌离子从细胞质内流出到细胞外或流进到细胞器内。ZnT-7 蛋白在小鼠十二指肠、空肠中含量高间接提示 ZnT-7 可能在小肠锌吸收中起作用(Kirschke and Huang, 2003)。ZnT-7 蛋白是通过增加高尔基体锌离子浓度来调节高葡萄糖介导的上皮细胞向间充质细胞转化过程(Zhang *et al.*, 2013)。Devergnas 等(2004)研究报道，给 HeLa 细胞补充 0 ~ 100 μmol/L 不同浓度的锌，对 ZnT-7 基因 mRNA 含量无影响，而当细胞缺锌时，可显著增加 ZnT7 基因 mRNA 表达。王辛等(2008)研究推测，ZnT7 可能参与了色素上皮层细胞褪黑激素的合成和包装过程。

在正常的蜂群中，工蜂的王浆腺有一个分泌周期，刚出房的幼蜂，王浆腺发育不完全，无分泌活性，随后 3 – 5 日龄工蜂开始进食花粉酿制蜂粮饲喂大幼虫，此时大量接触花粉中外源性锌离子，以茶花粉为例每克茶花粉中含锌 65.3 μg(杨开等, 2010)，工蜂消化吸收将外源性锌元素转化成工蜂体内必需微量元素，6 – 12 日龄王浆腺发育完全，工蜂开始分泌蜂王浆(董捷等, 2001)。蜂王浆主要是由王浆腺合成和分泌的(王瑞武等, 1992)，蜂王浆中含锌量大致在 19.55 μg/g 水平(刘克武等, 2001)，而锌转运蛋白-7 相似蛋白(ZnT-7-like)功能主要是协助锌离子从细胞质内流出到细胞外或流进到细胞器内(Gaither and Eide, 2001)，其表达很可能与外源性的锌离子进入细胞器促进王浆腺发育以及王浆中锌的含量有关。由于国内外研究大多集中于 ZnT-7 蛋白对动植物疾病作用方面，但对昆虫尤其是蜜蜂在其生长发育分泌王浆中的作用尚不清楚,目前尚未见到关于锌对 ZnT-7-like 蛋白表达的报道(于昱和王福俤, 2010)。为此，本研究以卡尼鄂拉蜂 *Apis mellifera carnica* 头部王浆腺总 RNA 为模板，RT-PCR 扩增获得 ZnT-7-like 基因片段，并将该基因片段亚克隆至原核表达载体 pGEX-4T-1，经 PCR、酶切鉴定以及测序正确后，成功诱导该基因多肽的高效表达，并以此表达产物制备了多克隆抗体，最后采用实时荧光定量 RT-PCR 以及 Western blot 技术检测该基因在不同日龄王浆腺中的相对表达量，为进一步探讨 ZnT-7-like 的生物学功能及其在蜜蜂王浆分泌过程中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试虫及取样

本实验卡尼鄂拉蜂 *A. mellifera carnica* 全部选自扬州大学实验蜂场。采用人工授精仪人工授精成熟处女王以保证所有子代都为全同胞，随机选取健康工蜂 30 头供多克隆抗体制备实验使用，另外从孵化第 1 天起用不同颜色染料在其背部标记，分别选取 3, 6, 9, 12 和 16 不同日龄健康工蜂各 60 头作为荧光定量 PCR 以及内源性 Western blot 检测样本；两组样本均于液氮速冻后放入 – 70℃ 冰箱保存，在冰台上解剖卡尼鄂拉蜂头部，取其王浆腺供 RNA 提取使用。

1.2　主要试剂

反转录试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit、*rTaq* 聚合酶、小量胶回收试剂盒、*Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ限制性内切酶、*E. coli* DH5α 感受态细胞、DL2000 和 DL5000 DNA Marker、荧光定量 PCR 试剂盒（DRR081A）均购自大连宝生物公司；BL21（DE3）感受态细胞购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；蛋白 Marker 购自 Thermo 公司；GST-Bind Purification Kit 试剂盒购自 Novagen 公司；辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自上海江莱生物科技有限公司；RIPA 裂解液购自碧云天公司；ECL 购自 Millipore 公司；其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.3　引物的设计与合成

1.3.1　ZnT-7-like 基因 cDNA 引物设计：根据高通量筛选结果比对哈佛大学计算生物学和功能基因研究实验室网站中卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因（http://compbio. dfci. harvard. edu/cgi-bin/tgi/gimain. pl? gudb = honeybee，GenBank 登录号：NP9550787），设计第 1 对引物扩增 ZnT-7-like 基因 cDNA 序列（表 1）。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Prime sequences（5′-3′）
ZnT-7-like-F1	GGAAGATCTATGAAAATGCTTCCTCTTTCACACAA
ZnT-7-like-R1	CGGGGTACCTCACATAGGTGCATAATCTAATTGA
ZnT-7-like-F2	GCGCgaattcAAAGATTCATGGGAAATTTT
ZnT-7-like-R2	GCGCctcgagTCACATAGGTGCATAATCTA
qZnT-7-like-F3	GCAGAAGTTTTAGGAGGATTTGTC
qZnT-7-like-R3	GAGAATGGGAATGGGAATGA
β-actin-F4	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG
β-actin-R4	GACCCACCAATCCATACGGA

序列中小写字母代表酶切位点。In sequences，lowercase letters represent the restriction enzyme cutting sites.

1.3.2　多克隆抗体制备所需多肽引物设计：根据跨膜结构分析结果结合上述卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因序列，设计第 2 对引物扩增其部分 cDNA 序列用于多克隆抗体制备使用，分别加入 GCGC 保护碱基，并在上下游引入酶切位点 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ（表 1），引物由上海生工合成。

1.3.3　ZnT-7-like 基因及内参基因 *β-actin* 荧光定量引物设计：根据荧光定量引物设计原则，设计第 3 对引物用于目的基因的扩增，第 4 对引物用于内参基因 *β-actin* 的扩增（表 1），引物由上海生工合成。

1.4　ZnT-7-like 基因 cDNA 的扩增

Trizol 法提取卡尼鄂拉蜂头部王浆腺的总 RNA。以总 RNA 为模板，参照 TaKaRa 公司 First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录，合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板，用第 1 对引物扩增 ZnT-7-like 序列。反应体系参照 *rTaq* DNA 聚合酶说明书，PCR 扩增反应条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 40 s，55.4℃ 退火 40 s，72℃ 延伸 65 s，共 35 个循环；72℃ 最终延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，在凝胶成像系统下紫外拍照。

1.5　重组质粒的构建及鉴定

以 cDNA 为模板，用第 2 对引物扩增多克隆抗体所需多肽序列。反应体系参照 *rTaq* DNA 聚合酶说明书，PCR 扩增反应条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 40 s，61℃ 退火 40 s，72℃ 延伸 40 s，共 35 个循环；72℃ 最终延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，在凝胶成像系统下紫外拍照。鉴定正确的 PCR 产物经切胶回收试剂盒回收纯化。

将纯化的 PCR 产物用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切获得目的片段，同时用这两种酶双酶切 pGEX-4T-1，回收目的载体。目的片段和目的载体在 T4 DNA 连接酶的作用下，16℃ 连接 16 h。连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，LB（Amp^+）固体培养基培养 12 ~ 16 h。挑选阳性克隆菌小提质粒，经酶切鉴定后，将含有正确插入片段的重组质粒命名为 pGEX-4T-1-ZnT-7-like，送上海生工生物工程有限公司测序。

1.6　生物信息学分析

蛋白质的理化性质分析采用 ProtParam 在线工具（http://web. expasy. org/protparam/）。系统进化树分析采用 MEGA 5 软件邻位连接法（Neighbor-Joining，NJ）构建。跨膜区预测采用 TMHMM 在线软件（http://www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM-2. 0/）。蛋白保守结构域通过 NCBI Conserved Domain 预测。

1.7　融合蛋白的诱导表达和纯化

将鉴定正确的重组质粒及空载体质粒转化于感受态 BL21（DE3），并接种到 LB（Amp^+）液体培养基中，于 37℃ 220 r/min 条件下过夜培养。取菌液按1∶100 体积比转入含 100 mg/L 的 5 mL LB

(Amp^+)培养基中，37℃ 220 r/min 振摇培养至 OD_{600} = 0.4 ~ 0.6 时，菌液加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG，于37℃下诱导表达6 h，收集菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析。同时设置 BL21 诱导和重组质粒未诱导为对照。重组质粒诱导后经超声波破碎并离心后收集上清和包涵体沉淀，超声波菌体破碎条件为：破碎4 s，间隔6 s，共30次，整个破碎过程历时5 min，注意确保超声探头深入液面以下，但不会碰到管底。

取超声波破碎后的包涵体沉淀，将沉淀称重，每克沉淀加入 10 mL Binding Buffer，4℃搅拌溶解过夜。蛋白纯化具体操作按 GST-Bind Purification Kit 试剂盒进行，纯化产物用 SDS-PAGE 电泳检测。

1.8 兔抗卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 多克隆抗体的制备

初次免疫，将纯化蛋白与弗氏完全佐剂按体积比1:1充分混匀，分别对2头新西兰白兔进行背部皮下多点注射(共计500 μg/头)。14 d后用弗氏不完全佐剂与纯化蛋白等体积混匀皮下注射，以后每14 d免疫一次，共加强免疫2 ~ 3次，加强免疫时均使用弗氏不完全佐剂。最后一次免疫7 d后，颈动脉放血，分离血清作为一抗。

1.9 抗体效价和特异性检测

分别用间接 ELISA 和 Western blot 法检测多克隆抗体的效价和特异性。

间接 ELISA：纯化的重组蛋白4℃过夜包被 ELISA 板(1 μg/孔)，用 PBST 配制的5%脱脂奶粉37℃封闭1 h，PBST 洗涤3次(5 min/次，以下同)；多抗血清作为一抗，按照1:2 000 (v/v)的比例稀释，37℃孵育1 h，PBST 洗涤3次；加入1:2 000 (v/v)稀释的 HRP 标记山羊抗兔二抗，37 ℃孵育1 h，PBST 洗涤3次后加入 TMB 显色底物，显色15 min 后加入终止液，酶标仪检测抗体效价读出 A_{450}值。

融合蛋白 Western blot：融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后在60 V，2 h 条件下电转移至 PVDF 膜上；5%脱脂奶粉室温封闭2 h，PBST 洗涤3次；用制备的多抗血清作为一抗，按1:2 000 (v/v)稀释后，4℃过夜轻摇振荡进行孵育，PBST 洗涤3次；用1:2 000稀释(v/v)的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 作为二抗，室温孵育3 h，PBST 洗涤3次；最终加入3, 3-二氨基联苯胺(DAB)避光显色。以空载体诱导后及重组载体诱导前的蛋白作为对照。

1.10 ZnT-7-like 基因在不同日龄卡尼鄂拉蜂王浆腺中的表达水平检测

各日龄王浆腺总 RNA 用 Trizol 试剂提取，反转录反应、实时荧光定量 PCR 均按各自试剂盒说明书操作。

实时荧光定量 PCR 反应体系配置均在冰台上进行，每个样品设3个重复，反应程序如下：先95℃预热30 s；接着进行40个循环的复制，退火温度为60℃；最后以95℃ 15 s，60℃ 60 s，95℃ 15 s 这一过程生成溶解曲线。

1.11 ZnT-7-like 蛋白的 Western blot 分析

1.11.1 不同日龄卡尼鄂拉蜂王浆腺组织样抽提：在冰台上解剖卡尼鄂拉蜂头部(每头部取完整王浆腺一个)，取3，6，9，12和16日龄王浆腺各5个，每组设置3个重复，用剪刀将组织块尽量剪碎，加500 μL RIPA 裂解液裂(含 PMSF)于匀浆器中，所有操作均在冰上进行，重复碾压、裂解，4℃下14 000 r/min 离心10 min，取上清加入 SDS 上样缓冲液，煮沸10 min，缓慢恢复室温后，稍离心，放于 -20℃保存待测。

1.11.2 BCA 法蛋白定量及浓度调整：按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作，用酶标仪570 nm 波长滤光片读取不同组别 OD 值，每组3个重复，计算不同组别蛋白浓度，再以 RIPA 调整蛋白浓度，加入5×还原样品缓冲液使样品终浓度控制在2 mg/mL，随后煮沸变性5 min。

1.11.3 内源性蛋白 Western blot 分析：将浓度一致的各组王浆腺蛋白上样检测(10 μg/孔)，在60 V 2 h条件下电转移至 PVDF 膜上；5%脱脂奶粉室温封闭2 h，PBST 洗涤3次；用制备的多抗血清作为一抗，按1:2 000 (v/v)稀释后，4℃过夜轻摇振荡进行孵育，PBST 洗涤3次；用1:2 000 (v/v)稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG 作为二抗，室温孵育3 h，PBST 洗涤3次，然后继续用 Stripping Buffer 洗膜，37℃洗膜30 min，ECL 显色，X-ray 胶片曝光显影后用 CCD 镜头扫描，内参 Western blot 实验中除一抗使用 β-Tubulin 多抗，二抗使用山羊抗兔 IgG (H + L) HRP，其余过程和内源性蛋白 Western blot 过程完全一致，最后用 Quantity-one 软件分别读取内源性蛋白和内参蛋白灰度值，进行内源性蛋白的相对定量分析。

1.12 数据统计与分析

采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪相应软件进行数据分析，EXCEL 整理数据。相对定量结果采用

$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行处理(Livak and Schmittgen, 2001)。基因与蛋白相对表达差异用 SPSS18.0 单因素方差分析法进行差异显著性分析，结果以平均值 ± 标准差表示。

2　结果

2.1　ZnT-7-like 基因的克隆和生物信息学分析

采用 ProtParam 和 TMHMM 在线工具分别预测 ZnT-7-like 蛋白的理化性质和跨膜结构。结果表明，该基因长 1 065 bp，编码 354 个氨基酸残基，分子量为 39.88 kDa，等电点为 7.39。生物信息学分析发现其编码的蛋白和 Cation_efflux 家族(PF01545)蛋白有很高的同源性，都含有一个 Cation_efflux 保守结构域和一个 CzcD 结构域。该基因命名为 ZnT-7-like 基因(zinc transporter 7-like gene)，GenBank 登录号为：NW_003378080。针对该基因全长序列设计特异性引物 1，以王浆腺总 RNA 为模板进行反转录，再以反转录得到的 cDNA 为模板扩增该基因全长序列。结果，PCR 产物在 1 000 bp 左右有明显的条带(图 1)，与预期 1 065 bp 相符。

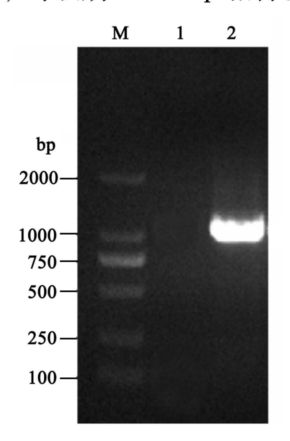


图 1　ZnT-7-like 基因 cDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR amplification results of ZnT-7-like cDNA

M：DNA 相对分子质量标准物 DL2000 DNA marker；1：阴性对照 Negative control；2：目的基因 Target gene cDNA.

选择卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因比对其他 10 个物种该基因 mRNA 序列，运用 MEGA 5 软件采用 NJ 法构建系统进化树(图 2)。

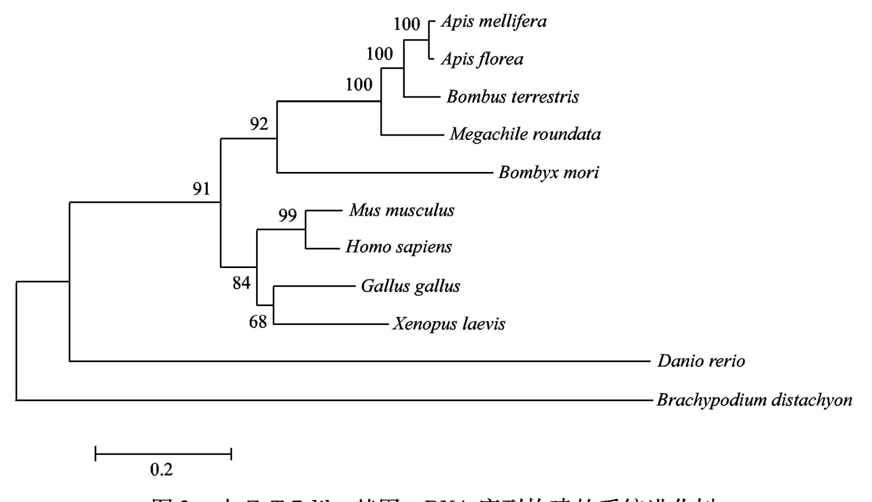


图 2　由 ZnT-7-like 基因 mRNA 序列构建的系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on the mRNA sequences of ZnT-7-like gene

利用 MEGA 5 软件链接 NCBI 网站，选择核酸数据库，添加包括卡尼鄂拉蜂在内的 11 个物种 mRNA 序列，先用 Clusta 做多序列比对，然后用邻位连接法构建系统进化树，重复抽样 500 次。节点附近的数字表示 500 次自举检验得到的 Bootstrap 值；比例尺表示每个位点的碱基替换数。We linked MEGA 5 software to NCBI website, selected nucleic acids database and added the mRNA sequences from 11 species including *Apis mellifera carnica*. Multiple sequence alignment was done through Clusta, and then phylogenetic tree was constructed by Neighbor-Joining method. Repeatedly sampling for 500 times. Numbers near nodes indicate the Bootstrap values from 500 replicates. The bar indicates the estimated number of substitutions per site.

预测该蛋白含有 6 个跨膜结构(图 3：A)，在大肠杆菌 BL21 蛋白表达过程中极易降解，为避免跨膜区域的干扰，结合抗原表位及同源性分析，根据保守结构域位置选择后 91 个氨基酸残基(对应基因 793 ~1 065 bp 位点，共计 273 bp)作为多克隆抗体制备多肽扩增序列。根据结构域预测后 273 bp

序列基本都囊括在 Cation_efflux 保守结构域和 CzcD 结构域中(图 3：B)，而保守结构域往往是有活性的结构域，可溶性表达有活性的功能域，能提高抗体制备的成功率。

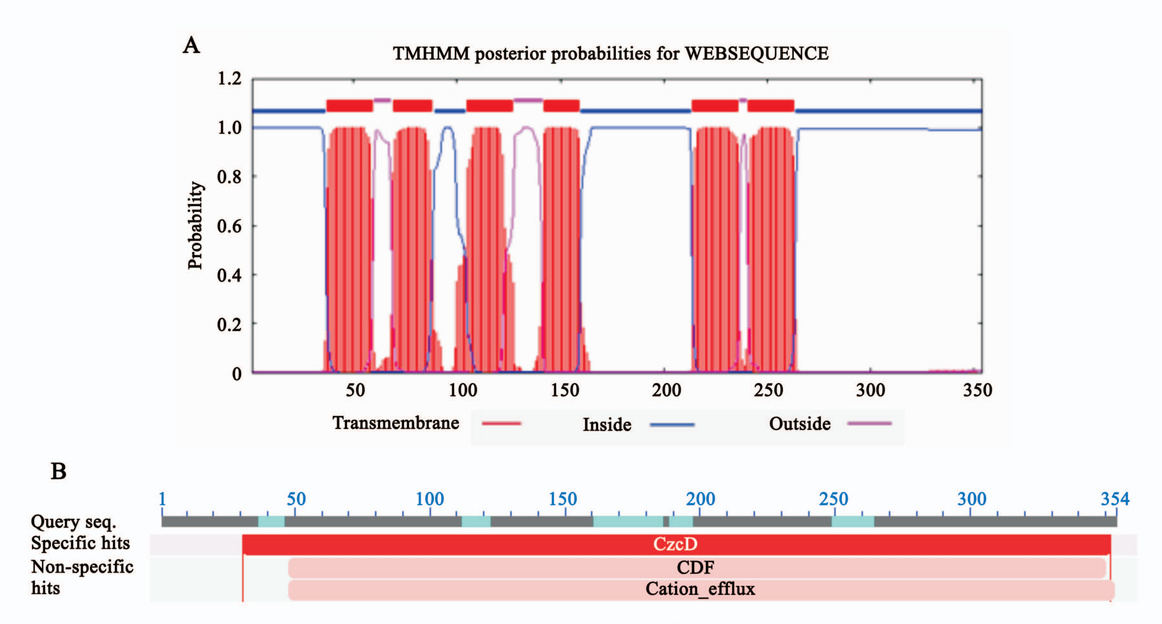


图 3 ZnT-7-like 蛋白生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformatics analysis of ZnT-7-like

A：跨膜结构预测 Transmembrane protein structure prediction；B：保守结构域 Conserved domain.

2.2 重组表达载体的构建

设计特异性引物 2，以王浆腺总 RNA 为模板进行反转录，再以反转录得到的 cDNA 为模板扩增该部分碱基序列。结果显示，PCR 产物在 250 bp 左右有明显的条带(图 4：A)，与预期 273 bp 相符。PCR 产物经切胶回收纯化并酶切后与 pGEX-4T-1 连接，得到的重组质粒命名为 pGEX-4T-1-ZnT-7-like。将重组质粒进行酶切鉴定(图 4：B)。用 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 进行双酶切鉴定，双酶切在 5 kb 和 273 bp 处有明显条带，这与预期结果相符。并且测序结果显示 100% 一致性，无任何碱基突变。

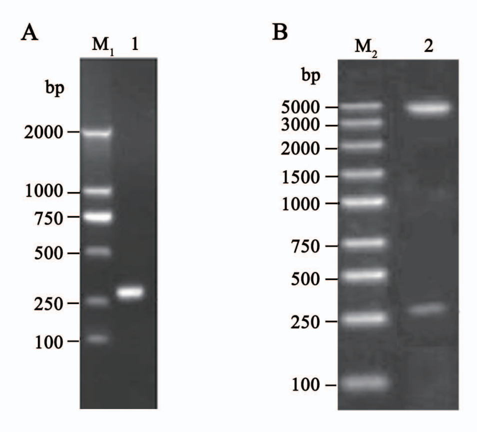


图 4 pGEX-4T-1 重组表达载体的构建

Fig. 4 pGEX-4T-1 construction of recombinant expression vector

A：ZnT-7-like 部分基因 cDNA 的 PCR 扩增结果 PCR amplification results of partial ZnT-7-like gene cDNA；B：pGEX-4T-1-ZnT-7-like 质粒双酶切鉴定结果 Enzyme digestion of pGEX-4T-1-ZnT-7-like. M_1：DL2000 DNA marker；M_2：DL5000 DNA marker；1：部分目的基因 cDNA 的 PCR 扩增产物 PCR amplification of partial target gene cDNA；2：*Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切 pGEX-4T-1-ZnT-7-like 质粒 Enzyme digestion of pGEX-4T-1-ZnT-7-like by *Eco*R Ⅰ and *Xho* Ⅰ.

2.3 GST-ZnT-7-like 融合蛋白的诱导表达及纯化

GST-ZnT-7-like 融合蛋白的诱导表达经 SDS-PAGE 电泳后结果如图 5 所示。重组质粒 pGEX-4T-1-ZnT-7-like 转化 *E. coli* BL21 (DE3)菌株后的诱导产物在约 35 kDa 处有 1 条与预期大小相符的特异蛋白带(箭头所指)，而 BL21 诱导和空载体 pGEX-4T-1 转化菌的诱导产物以及重组质粒 pGEX-4T-1-ZnT-7-like 转化菌的非诱导产物在该处却没有蛋白条带，这与预期结果是一致的，说明融合蛋白诱导表达成功。通过比较上清与包涵体沉淀的蛋白条带发现，绝大部分融合蛋白存在于包涵体沉淀中，而上清中仅有极少量甚至没有该融合蛋白，说明 GST-ZnT-7-like 融合蛋白主要是以包涵体的形式存在。

超声波破碎重组诱导菌的菌体，离心分离包涵体沉淀，GST-Bind Ni 柱纯化重组蛋白 GST-ZnT-7-

like，结果表明纯化效果较好(图6)，纯化的蛋白可以作为抗原免疫新西兰白兔。

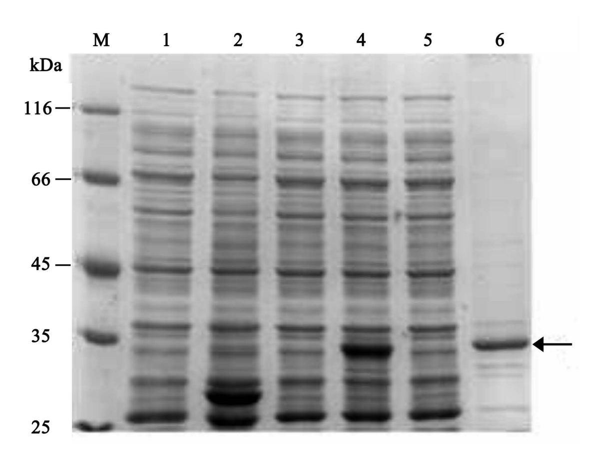


图5　GST-ZnT-7-like 融合蛋白的诱导表达

Fig. 5　Induced expression of the GST-ZnT-7-like fusion protein

M：蛋白质相对分子质量标准物 Protein marker；1：无质粒转化的 BL21 菌诱导后 *Escherichia coli* strain BL21；2：空载体 pGEX-4T-1 转化 BL21 菌诱导后 Expressed product of pGEX-4T-1；3：重组质粒 pGEX-4T-1-ZnT-7-like 转化 BL21 菌诱导前 Expressed product of pGEX-4T-1-ZnT-7-like not induced by IPTG；4：重组质粒转化 BL21 菌经 1 mmol/L IPTG 诱导后 Expressed product of pGEX-4T-1-ZnT-7-like induced by 1 mmol/L IPTG；5：重组质粒诱导后超声裂解上清 Supernatant of induced pGEX-4T-1-ZnT-7-like with sonication；6：重组质粒诱导后超声裂解包涵体沉淀 Precipitation of induced pGEX-4T-1-ZnT-7-like with sonication. 箭头示融合蛋白。The arrow indicates the fusion protein.

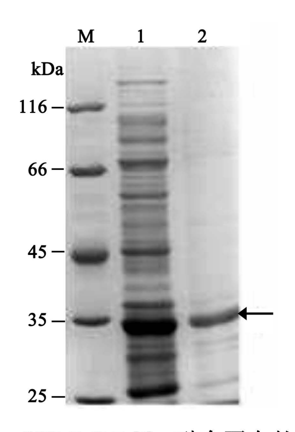


图6　GST-ZnT-7-like 融合蛋白的纯化

Fig. 6　Purification of the GST-ZnT-7-like fusion protein

M：蛋白质相对分子质量标准物 Protein marker；1：融合蛋白纯化前 Unpurified fusion protein；2：融合蛋白纯化后 Purified fusion protein. 箭头示纯化蛋白。The arrow indicates the purified protein.

2.4　兔抗卡蜂 ZnT-7-like 多克隆抗体的效价和特异性检测

用间接 ELISA 法检测抗体滴度，抗体滴度为 1∶64 000 (v/v)；Western blot 分析表明，在 35 kDa 处有蛋白特异带(图7)，证明制备的多克隆抗体能与 GST-ZnT-7-like 融合蛋白特异性结合，抗体的效价高、特异性强，而其他对照则无条带。

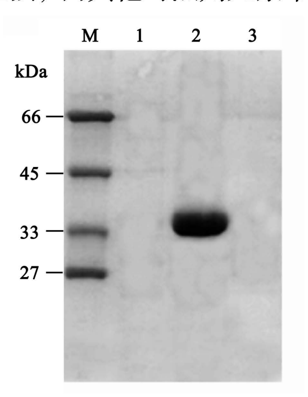


图7　兔抗卡蜂 ZnT-7-like 多克隆抗体特异性的 Western blot 检测

Fig. 7　Western blot detection of specificity of rabbit anti-*Apis mellifera carnica* ZnT-7-like polyclonal antibody

M：蛋白相对分子质量标准物 Protein marker；1：pGEX-4T-1 诱导前 Uninduced pGEX-4T-1；2：纯化的融合蛋白 Purified fusion protein；3：pGEX-4T-1 空载体诱导后 Induced pGEX-4T-1.

2.5　ZnT-7-like 基因在不同日龄间的差异表达

2.5.1　ZnT-7-like 基因表达水平分析：RT-PCR 反应结束后系统根据荧光值的变化规律，自动生成反应循环数与检测荧光量变化的扩增反应动力学曲线，用 SDS 1.4 软件对扩增结果进行观测。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法分别计算 ZnT-7-like 基因在 3，6，9，12 和 16 日龄王浆腺间的相对表达量，结果见图 8。

RT-PCR 扩增结果表明，目的基因和内参基因 RT-PCR 产物只有 1 个特异峰，产物特异性很好，无引物二聚体，可用于荧光定量的进一步分析。从图 8 可见，ZnT-7-like 基因在卡尼鄂拉蜂 5 个日龄王浆腺中的转录情况存在较大差异，表现为 3 日龄成虫中的表达量极显著高于其他日龄($P<0.01$)，12 日龄表达量最低，其他日龄间表达量两两差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。

2.5.2　ZnT-7-like 蛋白表达水平分析：卡尼鄂拉蜂不同日龄成虫王浆腺以及内参蛋白 Western blot 结果见图 9。采用 quantity-one 软件分别读取 ZnT-7-like 蛋白和内参 β-Tubulin 蛋白灰度值，以每个日龄比值(ZnT-7-like 蛋白灰度值/β-Tubulin 蛋白灰度值)的平均值表示 ZnT-7-like 蛋白在 3，6，9，12 和 16 日龄卡尼鄂拉蜂王浆腺间的相对表达量。从图 9 可见，ZnT-7-like 蛋白在卡尼鄂拉蜂 5 个日龄王浆腺中的蛋白表达也存在较大差异，表现为 3 日龄成

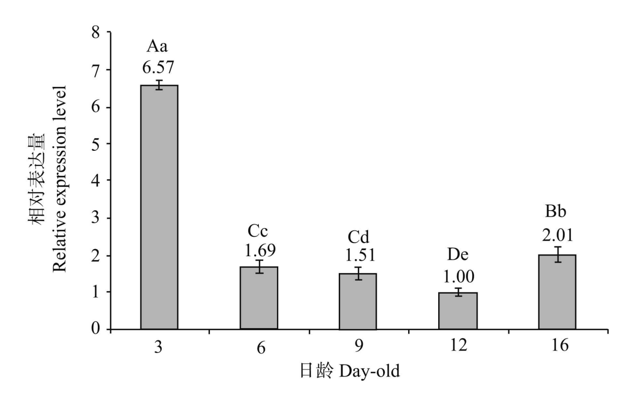


图 8 ZnT-7-like 基因在不同日龄卡尼鄂拉蜂成虫王浆腺中的表达情况

Fig. 8 Expression profiles of ZnT-7-like gene in hypopharyngeal glands of different day-old adults of *Apis mellifera carnica*

图中数值均为均数 ± 标准差；柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)；图 9 同。The data are expressed as mean ± *SD*; different small and capital letters above bars indicate significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$). The same for Fig. 9.

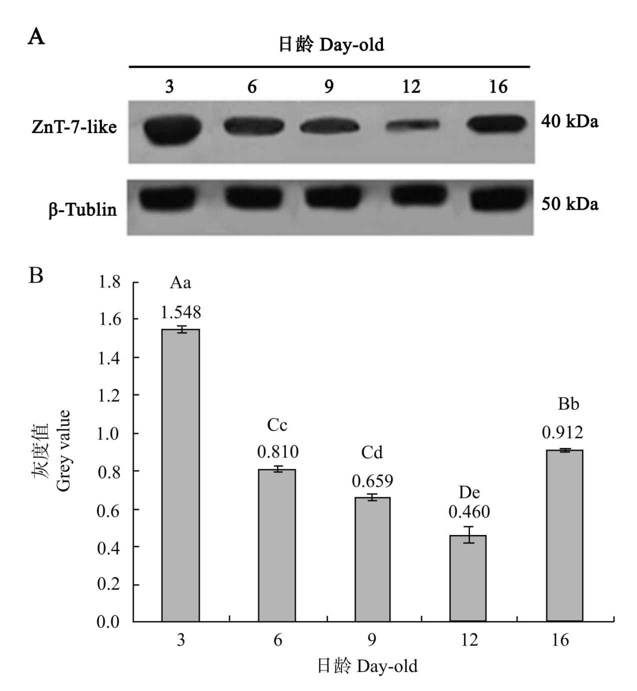


图 9 ZnT-7-like 蛋白在不同日龄卡尼鄂拉蜂成虫王浆腺中的表达情况

Fig. 9 Expression profiles of ZnT-7-like protein in hypopharyngeal glands of different day-old adults of *Apis mellifera carnica*

A：不同日龄成虫 ZnT-7-like 蛋白免疫印迹 Western blot of different day-old adults; B：不同日龄成虫 ZnT-7-like 蛋白灰度值 The grey values of the protein of different day-old adults.

虫中的表达量极显著高于其他日龄($P<0.01$)，12 日龄表达量最低，其他日龄间表达量两两差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。这与转录水平差异性规律是一致的。

3 讨论与结论

本研究成功克隆卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因，用该基因序列比对其他 10 个物种该基因 mRNA 序列，运用 MEGA 5 软件采用邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树，基本反映了这些物种的亲缘关系：卡尼鄂拉蜂与同为膜翅目的小蜜蜂 *Apis florea*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 以及切叶蜂 *Megachile rotundata* 先聚在一起，然后和鳞翅目家蚕 *Bombyx mori* 聚类，再与哺乳动物人 *Homo sapiens*、小鼠 *Mus musculus* 以及禽类原鸡 *Gallus gallus* 聚为一类，与斑马鱼 *Danio rerio* 以及植物二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* 亲缘关系最远。

重组菌诱导表达后，在细胞破碎后的上清中很难找到融合蛋白，表达产物几乎全部以包涵体沉淀形式存在，这可能与 pGEX-4T-1 系统的高效表达有关。蛋白表达量越高越容易形成包涵体，其原因一方面可能是蛋白合成的速度太快，以至于没有足够的时间进行折叠，二硫键不能正确地配对；另一方面，促使蛋白正确折叠的各种影响因子在原核表达系统中有所缺失，这也在一定程度上促进了包涵体的形成。本实验中，我们将包涵体沉淀经 GST-Bind Ni 柱纯化后免疫新西兰白兔，不影响多克隆抗体的制备。

为此，本实验通过构建卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因的重组原核表达载体，并将其转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中，通过诱导表达成功获得了卡尼鄂拉蜂 GST-ZnT-7-like 融合蛋白。重组表达菌经超声波破碎后 SDS-PAGE 电泳检测发现，绝大部分的融合蛋白存在于包涵体沉淀中，而上清中仅有极少量甚至没有该融合蛋白，这表明 GST-ZnT-7-like 融合蛋白主要是以包涵体的形式存在。融合蛋白经纯化后，免疫 2 只新西兰白兔，劲动脉放血收集血清。ELISA 和 Western blot 分别检测抗体效价与特异性，结果抗体效价高且特异性好。

实验提取 5 个日龄王浆腺 RNA 用于实时荧光定量 PCR 分析，3 个重复实验之间重复性较好，其值可信，而且基因扩增过程中无明显的引物二聚体形成，引物特异性较好。结果表明，ZnT-7-like 基因在卡尼鄂拉蜂 5 个日龄王浆腺中的转录情况存在显著差异，表现为 3 日龄最高，12 日龄最低。Devergnas 等(2004)研究报道当细胞缺锌时，可显

著增加 ZnT7 基因 mRNA 表达，3 日龄的该基因高表达可能与刚出房工蜂王浆腺细胞缺锌有关，此时蜜蜂开始进食花粉，接触大量外源性锌离子，在人、小鼠、大鼠等其他物种中该基因蛋白功能主要为协助锌离子从细胞质内流出到细胞外或流进到细胞器内，前言中也提及 ZnT-7 蛋白是通过增加高尔基体锌离子浓度来调节细胞转化过程(Zhang *et al.*, 2013)，卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 高表达以促进大量锌离子进入到细胞器特别是增加高尔基体锌离子浓度供腺体发育所需物质的合成和包装，随后工蜂 6－12 日龄王浆腺发育完全，细胞器对锌离子需求量降低，ZnT-7-like 表达量因而显著下降，荧光定量的结果很好地验证了这种假设。

另外，5 个日龄王内源性浆腺 ZnT-7-like 蛋白 Western blot 检测结果一方面证明卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因多克隆抗体的成功制备，表明应用于其他物种的多克隆抗体制备所采用的方法对于卡蜂 ZnT-7-like 基因的研究同样适用；同时也为深入研究卡蜂 ZnT-7-like 的生理功能，比如 ZnT-7-like 在不同蜜蜂品种、不同生长发育期和不同组织内的蛋白表达谱研究以及蛋白定位，鉴定 ZnT-7-like 的分子伴侣等打下了研究基础。另一方面也验证了荧光定量的结果，从蛋白层面进一步阐明该基因在卡尼鄂拉蜂王浆腺中的表达规律。虽然基因转录到表达需要经历翻译水平的调控过程，但这种滞后就 ZnT-7-like 的转录和翻译而言并不明显，蛋白的相对表达量和基因的相对表达趋势基本一致。

本研究成功克隆了卡尼鄂拉蜂 ZnT-7-like 基因，并诱导了融合蛋白的表达，证实融合蛋白主要是以包涵体沉淀的形式存在。纯化蛋白免疫新西兰白兔后，成功获得了兔抗卡蜂 ZnT-7-like 多克隆抗体，且效价和特异性均较高。实时荧光定量数据显示该基因在卡尼鄂拉蜂 5 个日龄王浆腺中的转录情况存在显著差异，表现为 3 日龄成虫中的表达量极显著高于其他日龄($P<0.01$)，12 日龄表达量最低，其他日龄间表达量两两差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。Western blot 检测结果显示不同日龄蛋白表达量与转录水平基本一致。本研究为进一步分析 ZnT-7-like 的调控方式及生物学功能奠定了基础。

参考文献(References)

Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA, 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34): 24085－24089.

Cragg RA, Christie GR, Phillips SR, Russi RM, Kury S, Mathers JC, Taylor PM, Ford D, 2002. A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25): 22789－22797.

Devergnas S, Chimienti F, Naud N, Pennequin A, Coquerel Y, Chantegrel J, Favier A, Seve M, 2004. Differential regulation of zinc efflux transporters ZnT-1, ZnT-5 and ZnT-7 gene expression by zinc levels: a real-time RT-PCR study. *Biochemical Pharmacology*, 68(4): 699－709.

Dong J, Wang RW, Qiao GH, Wang JM, 2001. The research progress of royal jelly gland in bees. *Apiculture of China*, 52(5): 11－13. [董捷，王瑞武，乔广辉，汪建明，2001. 蜜蜂王浆腺研究进展. 中国养蜂，52(5): 11－13]

Gaither LA, Eide DJ, 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, 14(3－4): 251－270.

Huang L, Kirschke CP, Gitschier J, 2002. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29): 26389－26395.

Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M, 2002. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21): 19049－19055.

Kirschke CP, Huang L, 2003. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6): 4096－4102.

Lichten LA, Cousins RJ, 2009. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual Review of Nutrition*, 29: 153－176.

Liu KW, Yang SZ, Liu XW, Min LE, Luo GJ, Yu D, Liu X, 2001. Flavonoid, macro- and trace-elements contents analysis for bee products. *Journal of Bee*, (3): 3－4. [刘克武，杨守忠，刘晓雯，闵丽娥，骆国军，喻东，刘鑫，2001. 几种蜂产品中类黄酮及部分常量和微量元素含量分析. 蜜蜂杂志，(3): 3－4]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25(4): 402－408.

Lopez V, Kelleher SL, 2009. Zinc transporter-2 (ZnT2) variants are localized to distinct subcellular compartments and functionally transport zinc. *Biochemical Journal*, 422(1): 43－52.

Prasad AS, 2009. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12: 646－652.

Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I, 2009. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(11): 780－791.

Shilstein SS, Breskin A, Chechik R, Feldman G, Vartsky D, 2004. *In vivo* determination of prostatic zinc: phantom feasibility study. *Physics in Medicine Biology*, 49(4): 485－499.

Wang FD, Bian W, Kong LW, Zhao FJ, Guo JS, Jing NH, 2001. Maternal zinc deficiency impairs brain nestin expression in prenatal

and postnatal mice. *Cell Research*, 11(2): 135 - 141.

Wang RW, Yang GH, Kuang YH, 1992. Factors influencing the hypopharyngeal gland activity in the workers of *Apis cerana*. *Acta Entomologica Sinica*, 35(4): 500 - 502. [王瑞武, 杨冠煌, 匡云华, 1992. 影响中华蜜蜂工蜂王浆腺活性的因素. 昆虫学报, 35(4): 500 - 502]

Wang X, Gao HL, Zheng W, Wang ZY, 2008. Localization of zinc transporter 7 in mouse retina. *Progress of Anatomical Sciences*, 14(2): 187 - 189. [王辛, 高慧玲, 郑玮, 王占友, 2008. 锌转运体 ZnT7 在小鼠视网膜的定位分布. 解剖科学进展, 14(2): 187 - 189]

Yang K, He JZ, Hu JR, Sun PL, Ye XQ, 2010. Determination and analysis of 20 major and micro elements in 12 kinds of pollen by ICP-AES. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 10(3): 227 - 232. [杨开, 何晋浙, 胡君荣, 孙培龙, 叶兴乾, 2010. 12 种花粉中 20 种常量和微量元素的 ICP-AES 法测定. 中国食品科学, 10(3) : 227 - 232]

Yu Y, Wang FD, 2010. Zinc transporters: critical regulators of zinc homeostasis. *Chinese Journal of Cell Biology*, 32(2): 176 - 188. [于昱, 王福俤, 2010. 锌转运蛋白家族 SLC39A/ZIP 和 SLC30A/ZnT 的研究进展. 中国细胞生物学学报, 32(2): 176 - 188]

Zhang XL, Liang D, Guo BL, Deng WY, Chi ZH, Cai Y, Wang LN, Ma JF, 2013. Zinc transporter 5 and zinc transporter 7 induced by high glucose protects peritoneal mesothelial cells from undergoing apoptosis. *Cellular Signalling*, 25(4): 999 - 1010.

Zhang XL, Liang D, Guo BL, Sun LX, Chi ZH, Cai Y, Wang LN, Ma JF, 2013. Zinc transporter 7 induced by high glucose attenuates epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells. *Biological Trace Element Research*, 151(1): 138 - 147.

(责任编辑: 赵利辉)